



Title	Complete nucleotide sequence of the prophage VT1-Sakai carrying the Shiga toxin 1 genes of the enterohemorrhagic Escherichia coli 0157 : H7 strain derived from the Sakai outbreak.
Author(s)	横山, 勝志
Citation	大阪大学, 2004, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/45257
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

氏名	横山 勝志
博士の専攻分野の名称	博士(医学)
学位記番号	第 18452 号
学位授与年月日	平成16年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 医学系研究科情報伝達医学専攻
学位論文名	Complete nucleotide sequence of the prophage VT1-Sakai carrying the Shiga toxin 1 genes of the enterohemorrhagic <i>Escherichia coli</i> O157 : H7 strain derived from the Sakai outbreak. (堺市で発生した腸管出血性大腸菌O157:H7に存在する志賀毒素1遺伝子を持つプロファージVT1-Sakaiの全塩基配列)
論文審査委員	(主査) 教授 品川日出夫 (副査) 教授 堀口 安彦 教授 本田 武司

論文内容の要旨

〔目的〕

腸管出血性大腸菌O157:H7は、出血性大腸炎を引き起こす病原性大腸菌の一種であり、その主要な病原因子は志賀毒素1や志賀毒素2である。O157:H7に存在する志賀毒素1をコードする *stx1* 遺伝子は溶原化したプロファージ上に存在する事が知られていたが、このプロファージの染色体上での挿入部位は不明であった。私は1996年に堺市でO157:H7による大規模な集団食中毒が発生した際に採取されたRIMD 0509952株を用い、*stx1* 遺伝子を持つこのプロファージの染色体上での挿入部位を決定すると共にその全DNA構造を明らかにする事を目的とした。

〔方法ならびに成績〕

O157:H7 RIMD 0509952株のゲノムDNAのコスミドライブラーを作製し、*stx1* DNAをプローブとしたハイブリダイゼーション法により、*stx1* 遺伝子を持つコスミドクローンを得た。このコスミドクローンの全塩基配列を決定した結果、*stx1* 遺伝子は大腸菌K12の47.7分に相当する領域に挿入されたファージ様の塩基配列上に存在する事が判明した。更に、ゲノムDNAをテンプレートとしたPCRを行う事により、コスミドクローンでカバーできなかつた残りのO157:H7特異的領域の塩基配列を決定した。*stx1* 遺伝子は全長47900bpのプロファージ上に存在しており、このプロファージをVT1-Sakaiと名付けた。

VT1-Sakaiの塩基配列及びORFは今までに報告されている種々のファージと部分的に高い相同性を示し、その全体構造は多種のファージによるモザイク構造を成していた。VT1-Sakaiの初期遺伝子の発現を調節するN・CI・Croタンパクをコードする遺伝子はそれらの認識配列も含め*stx1* 遺伝子や*stx2* 遺伝子を持つこれまでに報告されていた他のO157株のファージと異なっていた。*stx1* 遺伝子はファージの後期遺伝子の発現を調節するQタンパクをコードする遺伝子の下流に位置していた。Qタンパク及びその認識配列は*stx1* 遺伝子や*stx2* 遺伝子を持つ他のO157株のファージと高い相同性を示し、SOS支配下にあると予想された。実際にRIMD 0509952株をSOS誘発剤であるマイトイシンCで処理したところ、*stx1* 遺伝子を有するファージの誘導が起り、志賀毒素1の生産量も増加した。

VT1-Sakai の尾部遺伝子群の下流に存在するラムダファージの b region に相当する領域の ORF の 1 つは、大腸菌 K12 の SOS 遺伝子群の一つである *dinI* 遺伝子と相同性を示し、この遺伝子を *hdiI* (homolog of *dinI*) と名付けた。*hdiI* 遺伝子はプロモーター領域に LexA 結合配列を持っていたので、実際に SOS 刺激により *hdiI* 遺伝子の発現が誘導されるかをマイトイシン C での処理により調べたところ、その発現は K12 の *dinI* 遺伝子と同様に SOS 刺激により誘導された。プライマーエクステンション法により *hdiI* 遺伝子の mRNA の転写開始点を明らかにし、フットプリントイング法により *hdiI* 遺伝子のプロモーター領域に存在する LexA 結合部位を明らかにした。また、HdiI タンパクは SOS 刺激に対する SOS 遺伝子群の発現、ラムダファージの誘導、UmuD タンパクの切断を抑制していた。

[総括]

O157 : H7 RIMD 0509952 株に存在する VT1-Sakai の *N*・*cI*・*cro* 遺伝子及びそれらがコードするタンパクの認識配列が *stx1* 遺伝子や *stx2* 遺伝子を持つ既知のファージと異なるという事実は、*stx1* 遺伝子の伝達は異なる immune system を持つ種々のバクテリオファージによりもたらされている事を示唆している。その一方で、*Q* 遺伝子及びその認識配列は *stx1* 遺伝子を持つ既知のファージのそれらと高い相同性を示し、マイトイシン C での処理により *stx1* 遺伝子を持つファージの誘導や志賀毒素 1 の高発現がみられた。この事はファージの誘導や毒素の発現が *stx1* 遺伝子を持つ既知の O157 : H7 株と同様に Q タンパクにより調節されている事を示している。RIMD 0509952 株由来のファージはブラーク形成能を欠いており、VT1-Sakai はそれ自体では完全なファージ粒子を生じない欠陥プロファージであった。

その原因は VT1-Sakai の頭部遺伝子への IS の挿入や尾部遺伝子のフレームシフトと考えられる。VT1-Sakai には、大腸菌 K12 の *dinI* 遺伝子と相同性を持つ遺伝子 *hdiI* が存在していた。in vivo, in vitro の解析により、この遺伝子の発現は SOS レプレッサー LexA の支配下にあり、その遺伝子産物は SOS 応答をフィードバック阻害している事を明らかにした。

論文審査の結果の要旨

本研究は、腸管出血性大腸菌 O157 : H7 の主要な病原因子である志賀毒素 1 遺伝子 *stx1* を含むプロファージ VT1-Sakai の全ゲノム配列を決定し、*stx1* の発現機構を明らかにした。VT1-Sakai のゲノム配列をデータベースを利用して比較解析した結果、このプロファージはラムダ型の多種のファージが組み合わさったキメラであり、尾部と頭部の遺伝子に変異を持つ欠陥プロファージであることを明らかにした。志賀毒素 1 の產生はファージ後期遺伝子発現を調節する *Q* 遺伝子によって正に制御されていることを明らかにした。

本研究は、社会的に注目された病原性大腸菌 O157 : H7 の主要な病原因子である志賀毒素 1 遺伝子 *stx1* を含むプロファージの全ゲノム構造を明らかにし、病原性遺伝子の水平伝達の機構、毒素遺伝子 *stx1* の発現制御機構の解明に多大の貢献をした。よって、本研究は学位の授与に値すると考えられる。